

Wrocław, 10.08.2015

Recenzja rozprawy doktorskiej
mgr Michała Turniaka

Escherichia coli jest najczęściej stosowanym modelowym organizmem wśród bakterii. Do gatunku *E. coli* należą szczepy zarówno pożyteczne dla nas (produkcja witamin B i K) jak i chorobotwórcze. Poznaliśmy sekwencje genomów kilkuset różnych szczepów *E. coli*, a więc mogłoby się wydawać, że wiemy już prawie wszystko o tej bakterii. Jednakże tak nie jest. W ostatnich kilku latach przekonaliśmy się o tym jak stosunkowo mało rozumiemy tę bakterię i jak wymyka się ona spod naszej kontroli, czego wymownym dowodem była śmierć 53 ludzi zakażonych szczepem EAEC *E. coli* w Niemczech w roku 2011. Pomimo znajomości pełnej sekwencji genomu określonego szczepu *E. coli* nie jesteśmy w stanie przewidzieć skutków jakie dany szczep wywołać może w żywym organizmie, a w przypadku sporej części genów *E. coli* nie wiemy jaką pełnią funkcję. Ponadto, należy pamiętać, że mikrobiom człowieka jest bardzo zróżnicowany a rozwój zakażenia zależy nie tylko od szczepu *E. coli*, ale również od kondycji układu odpornościowego gospodarza jak i od składu jego mikroflory.

W tym świetle podjęte przez Doktorantkę badania zmierzające do poznania wzajemnych interakcji pomiędzy chorobotwórczymi szczepami *E. coli* – izolowanymi od dorosłych osób z zespołem jelita nadwrażliwego, a ludzkimi makrofagami, wydają się w pełni uzasadnione.

Oceniana rozprawa ma tradycyjny układ z podziałem na: Wstęp, Cel, Materiały i Metody, Wyniki i Omówienie oraz Dyskusję. Rozprawę kończą wnioski i streszczenie w języku polskim i angielskim. Początek „Wstępu” został poświęcony chorobotwórczym bakteriom przewodu pokarmowego ze szczególnym uwzględnieniem szczepów *E. coli*. W następnych obszernych podrozdziałach opisano fagocytozę i apoptozę w kontekście zakażenia pałeczkami jelitowymi. Sporo miejsca poświęcono mechanizmom obrony *E. coli* przed degradacją wewnątrz fagolizosomów komórek żernych. W ostatnich podrozdziałach „Wstępu” Doktorant opisał techniki badania apoptozy. Jednakże wydaje mi się, że opisywanie we „Wstępie” powszechnie znanych i stosowanych technik nie jest potrzebne i trochę dekoncentruje uwagę czytelnika. Uważam, że zamiast opisywania technik Doktorant we „Wstępie” powinien poruszyć kwestie

związane z zespołem jelita wrażliwego, IBS (*irritable bowel syndrome*), ponieważ szczepy *E. coli* analizowane w tym doktoracie były wyizolowane z próbek kału pochodzących od pacjentów z zespołem IBS. Dodatkowo Doktorant mógłby również zwrócić uwagę na złożoność mikrobiomu przewodu pokarmowego oraz jego zróżnicowanie w zależności od diety, stanu zdrowia w tym układu odpornościowego, etc. Poważnym mankamentem „Wstępu” są źle opisane ryciny. Podpisy pod rycinami są lakoniczne (np. ryc. 1 nie opisano co oznaczają 1, 2, 3 w części (a) oraz brak opisu części (a-f)) co powoduje, że trudno je zrozumieć bez sięgania do materiału źródłowego. Zdarza się, że nie są zacytowane materiały źródłowe skąd zaczerpnięto rysunki/schematy (ryc. 4, 6). Ponadto, na prezentowanych zdjęciach mikroskopowych powinna być podana podziałka (np. ryc. 8, 9, 10), a w podpisach nazwy przedstawianych komórek.

Cel pracy jest sformułowany poprawnie aczkolwiek mógłby być napisany bardziej precyzyjnie.

W rozdziale „Materiały i Metody” przedstawiono opis testów adhezji *E. coli* do komórek nabłonka, fagocytozy, oznaczania hydrofobowości szczepów *E. coli* oraz metod badania apoptozy. Duża część tego rozdziału poświęcona została genotypowaniu analizowanych szczepów *E. coli*. Ta część jest napisana starannie i przejrzyście. Na uwagę zasługuje stosunkowo duża różnorodność stosowanych technik.

Rozdział „Wyniki i Omówienie“ powinien zaczynać się krótkim wprowadzeniem wyjaśniającym dlaczego wybrano do badań szczepy *E. coli* pochodzące od osób z zespołem jelita nadwrażliwego. Podobnie nieco więcej informacji powinno być na temat podziału szczepów *E. coli* na grupy filogenetyczne; być może informacja taka powinna znaleźć się w „Wstępie”. Dodatkowo należy pamiętać, że niedawno Clermont i wsp. (2012) uaktualnili podział szczepów *E. coli* wprowadzając dodatkowe trzy grupy (C, E i F). Podobnie jak w rozdziale „Wstęp” opisy niektórych rycin są nieprawidłowe i nieprecyzyjne. Przykładowo w opisie ryciny 14 nie podano jaki szczep *E. coli* i jaki rodzaj nabłonka były analizowane w teście adhezji, ponadto nie opisano części A i B oraz nie zamieszczono skali. W zasadzie nie wiadomo kiedy użyto komórek ludzkich raka krtani, choć w „Materiałach i Metodach” są one wymienione i tu rodzi się pytanie: dlaczego do testów adhezji oprócz ludzkich komórek raka nabłonka jelita cienkiego wybrano komórki raka krtani? Dość istotnym problemem jest analiza statystyczna, przykładowo na wykresie 5 nie przedstawiono odchyłeń standardowych. Jeśli badano pięć szczepów, to trudno pisać, że „Najwięcej dzikich szczepów EAEC-IBS prezentowało gen *aggB* (60% spośród 5 szczepów)”.
(60% spośród 5 szczepów)”.

Podobnie jest napisane w „Dyskusji” „gen *aggB* wykryto u 60% badanych szczepów”. Czy sensownym jest wyciąganie średnich wartości np. indeksu przeżywalności dla pięciu szczepów (str. 48, tabela 12) reprezentujących różne patotypy, czy nie lepiej po prostu podać zakres przeżywalności (od 0 do 15,5). Myślę, że analizując korelację pomiędzy zdolnością szczepów *E. coli* do przeżywania w makrofagach a obecnością genów kodujących enzymy antyoksydacyjne dobrze byłoby w przyszłości sprawdzić poziom ekspresji tych genów. Doktorant analizując stopień pofragmentowania DNA makrofagów za pomocą elektroforezy w żelu agarozowym, nie skomentował braku DNA w ścieżkach 48-2 i IBS9. Wydaje mi się, że wyniki przedstawiające stopień fragmentacji DNA makrofagów (dane z FACSa) zakażonych analizowanymi szczepami *E. coli* (ryc. 20) powinny być zamieszczone jako załącznik. Niektóre z danych przedstawionych na tej rycinie są mało czytelne, a wyniki mało zróżnicowane i dlatego wystarczające jest przedstawienie tych danych w formie zbiorczego wykresu (wykres 4).

Doktorat krytycznie podchodzi do uzyskanych wyników, czego wyrazem jest rozdział „Dyskusja”. Mam świadomość, że Doktorantowi niełatwo było prowadzić dyskusję głównie ze względu na to, że otrzymane wyniki nie zawsze były spójne i jednoznaczne. Autor kończy dyskusję stwierdzeniem, że „ponieważ w pracy badano jedynie obecność genu *ompA*, niemożliwa jest ocena, czy białko OmpA faktycznie odpowiada za hamowanie apoptozy makrofagów”. W związku z tym mam pytanie do Doktoranta jakie doświadczenia zaplanowałby w celu wyjaśniania roli OmpA? Dodatkowo proszę Doktoranta o przedstawienie, które z wątków doktoratu (i w jaki sposób?) powinny być kontynuowane.

Za najważniejsze osiągnięcie rozprawy doktorskiej uważam wykazanie zaburzonej fagocytozy analizowanych szczepów EAEC, co może wyjaśniać zdolność tych szczepów do wywoływania przewlekłych zakażeń przewodu pokarmowego.


Rozprawa doktorska jest napisana poprawnym językiem i znalazłam tylko nieliczne, drobne błędy.

Drobne błędy:

- Gram z dużej litery (nazwisko duńskiego badacza)
- błędy językowe: monolayer, pik, czasami można zastąpić patogenny szczep chorobotwórczym szczepem, ligacja np. PAMP z receptorami fagocytów, powinno być oddziaływanie

- na wykresie 5 nie podano, przy jakiej długości fali wykonywano oznaczanie (podano jedynie symbol OD)
- brak w skrótach rpm
- podając warunki wirowania w rpm należy podać typ rotora.

W podsumowaniu stwierdzam, że przedstawiona mi do recenzji praca spełnia wymogi stawiane rozprawom doktorskim. Wnoszę zatem do Wysokiej Rady Wydziału Lekarskiego Uniwersytetu Medycznego im. Piastów Śląskich o dopuszczenie mgr Michała Turnika do dalszych etapów przewodu doktorskiego.



Prof. dr hab. Jolanta Zakrzewska-Czerwińska